

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002年3月7日 (07.03.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/18953 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/543 (SAKAKI, Shujiro) [JP/JP]; 〒305-0045 茨城県つくば市梅園二丁目15番5号 Ibaraki (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/07385
- (22) 国際出願日: 2001年8月28日 (28.08.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2000-259964 2000年8月29日 (29.08.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和メデックス株式会社 (KYOWA MEDEX CO., LTD) [JP/JP]; 〒104-0042 東京都中央区入船二丁目1番1号 Tokyo (JP). 日本油脂株式会社 (NOF CORPORATION) [JP/JP]; 〒150-6019 東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 重信香代子 (SHIGENOBU, Kayoko) [JP/JP]; 〒411-0932 静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600番1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内 Shizuoka (JP). 首藤健志郎 (SHUTO, Kenshiro) [JP/JP]; 〒300-3261 茨城県つくば市花畑三丁目7番1号 Ibaraki (JP). 榊秀次郎
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: HIGHLY REPRODUCIBLE AGGLUTINATION IMMUNOASSAY METHOD AND REAGENTS

(54) 発明の名称: 再現性良好な凝集イムノアッセイ法及び試薬

(57) Abstract: A highly reproducible agglutination immunoassay method wherein the agglutination of insoluble carrier particles (latex, etc.) is stabilized and uniformized and immunoassay reagents to be used therein. In an agglutination immunoassay method comprising bonding an antigenic substance in a test sample to insoluble carrier particles, to which neither an antigen nor an antibody is substantially bonded, and then bonding an antibody or an antibody complex specifically reacting with the antigenic substance thereto to thereby selectively agglutinate the insoluble carrier particles, use is made of a polymer formed by homopolymerizing a monomer having phosphorylcholine and vinyl groups (for example, 2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine) or copolymerizing such a monomer having phosphorylcholine and vinyl groups with another monomer having vinyl group (for example, n-butyl methacrylate).

[続葉有]

WO 02/18953 A1



(57) 要約:

ラテックス等の不溶性担体粒子の凝集を安定化・均一化させ、再現性に優れた凝集イムノアッセイ法やそれに用いる免疫測定試薬を提供するものである。抗原又は抗体を実質的に結合していない状態にある不溶性担体粒子に対して、被検試料中の抗原性物質を結合させ、該抗原性物質に特異的に反応する抗体又は抗体複合体を結合させて、不溶性担体粒子を選択的に凝集させる凝集イムノアッセイ法において、２-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン等のホスホリルコリン基とビニル基を有する単量体を単独重合、あるいは該ホスホリルコリン基とビニル基を有する単量体とメタクリル酸-n-ブチル等のビニル基を有する単量体とを共重合したポリマーを用いる。

明 細 書

再現性良好な凝集イムノアッセイ法及び試薬

5 技術分野

本発明は、生体試料などの水溶性媒体中の抗原性物質を、凝集反応を利用して免疫学的に測定する凝集イムノアッセイ法や、それに用いる免疫測定試薬に関する。

10 背景技術

近年、病院、検査センター等において、人手不足、コスト削減、あるいは多量の検体処理等の点から、臨床検査等の諸検査の自動化、測定時間の短縮化が図られている。このような自動化に適した方法として、不溶性担体粒子の凝集反応を利用して抗原性物質を定量する凝集イムノアッセイ法が注目されている。例えば、特開平7-35752号公報には、抗原又は抗体を実質的に結合していない状態にある不溶性担体粒子に対して、被検試料中の抗原性物質を結合させ、該抗原性物質に特異的に反応する抗体又は抗体複合体を結合させて、不溶性担体粒子を選択的に凝集させる凝集イムノアッセイ法が記載されている。

しかし、不溶性担体粒子と、抗原又は抗体とが凝集反応を起こす際の凝集の不均一化によって、再現性良く反応を起こさせることが難しく、特に、抗原又は抗体を実質的に結合していない状態にある不溶性担体粒子に対して、被検試料中の抗原性物質を結合させ、該抗原性物質に特異的に反応する抗体又は抗体複合体を結合させて、不溶性担体粒子を選択的に凝集させる凝集イムノアッセイ法においては、抗体の不溶性担体粒子への直接結合等の問題もあり、さらなる再現性の向上が求められてい

た。

- 本発明の課題は、抗原又は抗体を実質的に結合していない状態にある不溶性担体粒子に対して、被検試料中の抗原性物質を結合させ、該抗原性物質に特異的に反応する抗体又は抗体複合体を結合させて、不溶性担体粒子を選択的に凝集させる凝集イムノアッセイ法において、凝集を安定化・均一化させ、非特異的吸着を防止し、再現性を改善する方法やそれに用いる免疫測定試薬を提供することにある。

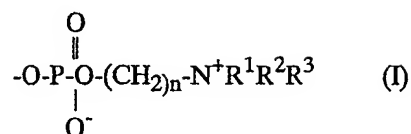
発明の開示

- 10 発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究し、抗原又は抗体を実質的に結合していない状態にある不溶性担体粒子に対して、被検試料中の抗原性物質を結合させ、該抗原性物質に特異的に反応する抗体又は抗体複合体を結合させて、不溶性担体粒子を選択的に凝集させる凝集イムノアッセイ法において、ホスホリルコリン類似基を有する化合物が、
- 15 抗原抗体反応による担体粒子の凝集を促進、均一化する作用を有することを見出し、この作用によって凝集イムノアッセイにおける凝集量の安定化・均一化と再現性の改善が達成されることを確認し、本発明を完成するに至った。

- すなわち本発明は、抗原又は抗体を実質的に結合していない状態にある不溶性担体粒子に対して、被検試料中の抗原性物質を結合させ、該抗原性物質に特異的に反応する抗体又は抗体複合体を結合させて、不溶性担体粒子を選択的に凝集させる凝集イムノアッセイ法において、式（I）
- （式中、 n は1～6の整数、 R^1 、 R^2 及び R^3 は、同一又は異なって、水素、炭素数1～6の置換又は非置換アルキルを示す。）で表される基
- 25 を有する化合物を用いることを特徴とする凝集イムノアッセイ法（請求項1）や、式（I）で表される基を有する化合物が、式（I）で表され

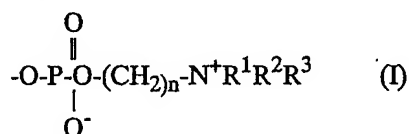
- る基を有する単量体を重合させて得られる化合物であることを特徴とする請求項1記載の凝集イムノアッセイ法（請求項2）や、式（I）で表される基を有する化合物が、式（I）で表される基を有する単量体と、該式（I）で表される基を有する単量体と重合可能な他の単量体とを重合させて得られる化合物であることを特徴とする請求項1記載の凝集イムノアッセイ法（請求項3）や、式（I）で表される基を有する単量体と重合可能な他の単量体が、ビニル基を有する単量体であることを特徴とする請求項3記載の凝集イムノアッセイ法（請求項4）や、ビニル基を有する単量体が、メタクリル酸-n-ブチルであることを特徴とする
- 5 請求項4記載の凝集イムノアッセイ法（請求項5）や、式（I）で表される基を有する単量体が、式（I）で表される基とビニル基を有する単量体であることを特徴とする請求項2～5のいずれか記載の凝集イムノアッセイ法（請求項6）や、式（I）で表される基が、ホスホリルコリン基であることを特徴とする請求項1～6のいずれかに記載の凝集イムノアッセイ法（請求項7）や、式（I）で表される基とビニル基を有する単量体が、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンであることを特徴とする請求項6記載の凝集イムノアッセイ法（請求項8）や、抗体が抗ヘモグロビンA1cモノクローナル抗体である請求項1～8のいずれかに記載の凝集イムノアッセイ法（請求項9）や、抗体複合体が、
- 10 抗原性物質に特異的に反応する抗体と、これに選択的に反応する第二抗体からなる請求項1～9のいずれかの凝集イムノアッセイ法（請求項10）や、不溶性担体が、ポリスチレン系ラテックスである請求項1～10のいずれかに記載の凝集イムノアッセイ法（請求項11）に関する。
- 15 20

(化学式 1)



- また、本発明は、抗原又は抗体を実質的に結合していない状態にある不溶性担体粒子に対して、被検試料中の抗原性物質を結合させ、該抗原
- 5 性物質に特異的に反応する抗体又は抗体複合体を結合させて、不溶性担体粒子を選択的に凝集させる凝集イムノアッセイ法に用いる、式 (I)
- (式中、n は 1 ～ 6 の整数、R¹、R² 及び R³ は、同一又は異なって、水素、炭素数 1 ～ 6 の置換又は非置換アルキルを示す。) で表される基を有する化合物を含有することを特徴とする免疫測定試薬(請求項 1 2)
- 10 や、式 (I) で表される基を有する化合物が、式 (I) で表される基を有する単量体を重合させて得られる化合物であることを特徴とする請求項 1 2 記載の免疫測定試薬 (請求項 1 3) や、式 (I) で表される基を有する化合物が、式 (I) で表される基を有する単量体と、該式 (I) で表される基を有する単量体と重合可能な他の単量体を重合させて得
- 15 られる化合物であることを特徴とする請求項 1 2 記載の免疫測定試薬 (請求項 1 4) や、式 (I) で表される基を有する単量体と重合可能な他の単量体が、ビニル基を有する単量体であることを特徴とする請求項 1 4 記載の免疫測定試薬 (請求項 1 5) や、ビニル基を有する単量体が、メタクリル酸-n-ブチルであることを特徴とする請求項 1 5 記載の免疫
- 20 測定試薬 (請求項 1 6) や、式 (I) で表される基を有する単量体が、式 (I) で表される基とビニル基を有する単量体であることを特徴とする請求項 1 3 ～ 1 6 のいずれか記載の免疫測定試薬 (請求項 1 7) や、式 (I) で表される基が、ホスホリルコリン基であることを特徴とする請求項 1 2 ～ 1 7 のいずれか記載の免疫測定試薬 (請求項 1 8) や、式

- (I) で表される基とビニル基を有する単量体が、2-メタクリロイル
 オキシエチルホスホリルコリンである請求項17記載の免疫測定試薬
 (請求項19) や、抗体が抗ヘモグロビンA1cモノクローナル抗体で
 あることを特徴とする請求項12～19のいずれか記載の免疫測定試薬
 5 (請求項20) や、抗体複合体が、抗原性物質に特異的に反応する抗体
 と、これに選択的に反応する第二抗体からなることを特徴とする請求項
 12～20のいずれか記載の免疫測定試薬(請求項21) や、不溶性担
 体が、ポリスチレン系ラテックスであることを特徴とする請求項12～
 21のいずれか記載の免疫測定試薬(請求項22) に関する。
- 10 (化学式2)

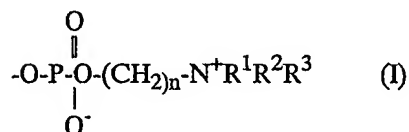


発明を実施するための最良の形態

- 本発明の凝集イムノアッセイ法としては、抗原又は抗体を実質的に結
 合していない状態にある不溶性担体粒子に対して、被検試料中の抗原性
 15 物質を結合させ、該抗原性物質に特異的に反応する抗体又は抗体複合体
 を結合させて、不溶性担体粒子を選択的に凝集させる凝集イムノアッセ
 イ法において、以下に示す式(I) (式中、nは1～6の整数、R¹、
 R²及びR³は、同一又は異なって、水素、炭素数1～6の置換又は非置
 20 換アルキルを示す。) で表される基を有する化合物を用いる方法であれ
 ば特に制限されるものではなく、また、本発明の免疫測定試薬としては、
 抗原又は抗体を実質的に結合していない状態にある不溶性担体粒子に対
 して、被検試料中の抗原性物質を結合させ、該抗原性物質に特異的に反
 応する抗体又は抗体複合体を結合させて、不溶性担体粒子を選択的に凝

集させる凝集イムノアッセイ法に用いる、式（I）で表されるホスホリルコリン類似基を有する化合物を含有するものであれば特に制限されるものではないが、ここで結合とは、物理吸着、化学結合の両方を意味する。

5 （化学式 3）



- 上記本発明における不溶性担体粒子としては、抗原又は抗体を実質的に結合していない状態で被検試料中の抗原性物質を結合させることができる不溶性粒子であれば特に制限されるものではなく、例えば特公昭 5
- 10 8-11575号公報等に記載されている従来公知の有機高分子物質の微粒子や、無機酸化物の微粒子や、あるいは核となるこれらの物質の表面を有機物等で表面処理した微粒子を挙げることができ、具体的には、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、（メタ）アクリル樹脂、ポリメチルメタクリレート等の合成樹脂（ラテックス）；ニトロセル
- 15 ルロース、セルロース、メチルセルロース等のセルロース誘導体；金属、セラミック、ガラス、シリコンラバー等の無機物を例示することができ、これらの中でもポリスチレン系の合成高分子、特に、電荷を与える為に成分としてアクリル酸系のモノマーやスルホン酸をもつモノマーなどを共重合したポリスチレン系の合成高分子が好ましい。
- 20 上記のように本発明においては、不溶性担体粒子として、ポリスチレンラテックス等のラテックス粒子が特に好ましく用いられる。例えばポリスチレンラテックス等の表面の疎水性が強いラテックスを用いると、タンパク質やペプチドの吸着をスムーズにすることができる。また、ソープフリーによって得られるポリスチレン粒子は、表面の負電荷同士の

反発に基づき、界面活性剤なしでも安定に存在できるので特に好ましく用いることができる。その他、種々の変性ラテックス（例えば、カルボン酸変性ラテックス）、磁性ラテックス（磁性粒子を内包させたラテックス）等を必要に応じて用いることもできる。

- 5 定量的にイムノアッセイを行う場合、通常は、不溶性担体粒子の大きさの均一性、表面状態の制御、内部構造の選択などが高度の次元で要求されるが、このような試薬向けの良好なラテックス等の不溶性担体粒子は、市販品の中から選択して用いることが可能である。また、不溶性担体粒子の形状としては、特に制限されるものではないが、例えば、球状
- 10 等を挙げることができ、球状の場合の粒子系としては、例えば平均粒径 $0.03 \sim 0.8 \mu\text{m}$ が好ましく、平均粒径 $0.06 \sim 0.2 \mu\text{m}$ がより好ましい。そして、本発明における不溶性担体粒子の反応液中の濃度としては特に制限されるものではないが、例えば、 $0.001 \sim 10$ 重量%、好ましくは $0.005 \sim 5$ 重量%、より好ましくは $0.01 \sim 2$
- 15 重量%の濃度で使用することが、不溶性担体粒子の凝集反応をより安定化・均一化することができるので好ましい。

- 上記本発明の式 (I) で表される基を有する化合物としては、式 (I) 中の n が $1 \sim 6$ の整数であって、 R^1 、 R^2 及び R^3 が同一又は異なってもよく、水素、炭素数 $1 \sim 6$ の置換又は非置換アルキルを示す式 (I)
- 20 で表される基を有する化合物であれば特に制限されるものではなく、式 (I) における R^1 、 R^2 及び R^3 のアルキル部分としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、イソブチル、ペンチル、ヘキシル等を挙げることができる。また、置換アルキルの置換基としては、置換数 $1 \sim 3$ の、例えばヒドロキシ、アリル等を挙げることができ、アリルと
- 25 しては、ベンジル、ナフチル等を例示することができる。

また、式 (I) で表される基を有する化合物としては、式 (I) で表

される基を有する単量体、好ましくは式 (I) で表される基とビニル基を有する単量体を重合させて得られる化合物や、式 (I) で表される基を有する単量体、好ましくは式 (I) で表される基とビニル基を有する単量体と、かかる式 (I) で表される基を有する単量体と重合可能な他の単量体とを重合させて得られる化合物を挙げることができる。また、式 (I) で表される基を有する単量体と重合可能な他の単量体としてはビニル基を有する単量体が好ましい。

本発明における式 (I) で表される基としてはホスホリルコリン基（以下、P C基と略する）を好適に例示することができ、したがって、本発明における式 (I) で表される基を有する化合物としては、P C基を有する化合物が好ましい。また、P C基を有する化合物としては特に制限されるものではないが、P C基を有する単量体、好ましくはP C基とビニル基を有する単量体を重合させて得られる高分子化合物や、P C基を有する単量体、好ましくはP C基とビニル基を有する単量体と、かかるP C基を有する単量体と重合可能な他の単量体とを重合させて得られる高分子化合物が好ましい。

上記P C基とビニル基を有する単量体としては特に制限がないが、例えば、2-アクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（以下、MPCと略す）、2-（メタ）アクリロイルオキシエトキシエチルホスホリルコリン、6-（メタ）アクリロイルオキシヘキシルホスホリルコリン、10-（メタ）アクリロイルオキシエトキシノニルホスホリルコリン、アリルホスホリルコリン、ブテニルホスホリルコリン、ヘキセニルホスホリルコリン、オクテニルホスホリルコリン、デセニルホスホリルコリン等を具体的に挙げることができる。また、これら単量体は、例えば、特開昭54-6325号公報、特開昭58-154591号公報等に示された公知の方法によ

って製造することができる。

前記のPC基を有する単量体と重合可能な他の単量体、好ましくはビニル基を有する他の単量体としては、例えば、(メタ)アクリル酸メチル、(メタ)アクリル酸エチル、(メタ)アクリル酸-n-ブチル、(メタ)アクリル酸イソブチル、(メタ)アクリル酸ペンチル、(メタ)アクリル酸ヘキシル、(メタ)アクリル酸ヘプチル、(メタ)アクリル酸オクチル、(メタ)アクリル酸トリデシル、2-ヒドロキシエチルメタクリレート等の(メタ)アクリル酸エステル；(メタ)アクリレート；スチレン、 α -メチルスチレン、メチル核置換スチレン、クロロ核置換スチレン等のスチレン系単量体；塩化ビニル、塩化ビニリデン、エチレン、プロピレン、イソブチレン等の置換又は非置換炭化水素系単量体；酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル等のビニルエステル系単量体；エチルビニルエーテル、n-ブチルビニルエーテル等のビニルエーテル系単量体；ジエチルイタコネート、ジ-n-ブチルイタコネート等を挙げることができるが、これらの中でも、メタクリル酸エステル、スチレン等が好ましく、特にメタクリル酸-n-ブチル（以下、BMAと略す）が好ましい。

PC基含有重合体を調製するには、前記PC基を有する単量体を含む重合成分を、例えば重合開始剤を用いたラジカル重合等の通常の方法により重合させることにより得ることができる。また、重合開始剤としては、通常の方法のラジカル重合開始剤であれば特に限定されるものではなく、2, 2'-アゾビス-(2-メチルプロピオノアミジン)二塩塩、4, 4'-アゾビス-(4-シアノ吉草酸)、2, 2'-アゾビス-(2-(5-メチル-2-イミダゾリン-2-イル)プロパン)二塩酸塩、2, 2'-アゾビスイソブチルアミド二水和物、2, 2'-アゾビスイソブチロニトリル、過硫酸アンモニウム、過硫酸カリウム、過酸化ベンゾイ

- ル、ジイソプロピルペルオキシジカーボネート、*t*-ブチルペルオキシ-2-エチルヘキサノエート、*t*-ブチルペルオキシピバレート、*t*-ブチルペルオキシジイソブチレート、過酸化ラウロイル、アゾビスイソブチロニトリル、2, 2'-アゾビス(2, 4-ジメチルバレロニトリル)、*t*-ブチルペルオキネオデカノエートや、これらの混合物等を好適に例示することができる。特に、前記MPCを単独重合させる際、あるいはMPCとビニル基を有するBMA等の他の単量体とを重合させる際には、重合性などの点からして重合開始剤として2, 2'-アゾビスイソブチロニトリル(以下、AIBNと略す)を用いることが好ましい。
- 10 これら重合開始剤の使用量は特に制限されるものではないが、用いる全単量体100重量部に対して0.01~10重量部が好ましく、0.1~5重量部が特に好ましい。また、重合条件は、好ましくは30~80℃、特に好ましくは40~70℃において2~72時間重合させるのが望ましい。この際、重合反応をより円滑に行なうために溶媒を用いてもよく、かかる溶媒としては、水、メタノール、エタノール、プロパノール、*t*-ブタノール、ベンゼン、トルエン、ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、クロロホルムや、これらの混合物等を挙げることができる。特に、前記MPCを単独重合させる際、あるいはMPCとビニル基を有する他の単量体とを重合させる際には、溶解性、重合性など
- 15 20 から水、エタノールを用いることが特に好ましい。得られた重合体の精製は、再沈殿法、透析法、限外濾過法など一般的な精製方法により行うことができる。

- また、PC基含有重合体中のPC基含有割合は、PC基含有重合体に対し、1~100モル%、特に5~10モル%が好ましい。含有割合が
- 25 1モル%未満の場合には、非特異的吸着を防止することが困難になるので好ましくない。またPC基含有重合体は、重合温度、重合開始剤使用

量、重合度調整剤の使用等によっても異なるが、数平均分子量 (M_n)
1000~1,000,000、特に1,000~500,000の重合
体が好ましい。本発明のPC基を有する化合物の反応液中の濃度として
は特に制限されるものではないが、0.0001~10%が好ましく、
5 0.001~5%がより好ましく、0.01~1%が特に好ましい。0.
0001%未満では、再現性の改善効果が弱く、また、10%以上では
泡立ちが激しく、気泡による測定誤差を招く恐れがあり好ましくない。
そして、PC基を有する化合物としては特に限定されるものではないが、
MPCの単独重合体あるいは、MPCとBMAの共重合体が特に好まし
10 い。

本発明において凝集イムノアッセイ法とは、抗原又は抗体を実質的に
結合していない状態にある不溶性担体粒子に対して、被検試料中の抗原
性物質を結合させ、該抗原性物質に特異的に反応する抗体又は抗体複合
体を結合させて、不溶性担体粒子を選択的に凝集させる方法をいうが、
15 本発明において使用する抗体又は抗体複合体が、不溶性担体粒子に結合
された抗原性物質のみならず、未結合の抗原性物質とも反応し測定値に
影響を与えるようなときは、被検試料中の抗原性物質を不溶性担体粒子
に結合させた後に該不溶性担体を洗浄して未結合の抗原性物質を除去す
る方法、不溶性担体粒子に結合される抗原性物質の比率を高くする方法、
20 また不溶性担体粒子に結合された抗原性物質とは反応するが、液相中の
抗原性物質と実質的に反応しない抗体又は抗体複合体を使用する方法等
を用いることができる。

本発明において、不溶性担体粒子は緩衝液等の水性媒体中に懸濁させ
た、いわゆるラテックスとして通常用いられる。かかる緩衝液調製用の
25 緩衝剤としては、例えば、リン酸、炭酸、有機酸緩衝剤の他、グッド緩
衝剤と呼ばれるものを使用することができる。これらを含む液のp

Hを調節する酸類としては通常の塩酸、硫酸、硝酸等の無機酸の他、酢酸等の有機酸を用いることができ、またpHを調節するアルカリとしては水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、水酸化アンモニウムなどを用いることができる。また、本発明においては、検体中の

5 脂質の可溶化に効果のある界面活性剤も使用することができ、特にポリオキシエチレングリコール基を持ったノニオン系界面活性剤やその他カチオン系、アニオン系の界面活性剤も必要に応じて使用することができる。

本発明の凝集イムノアッセイ法の測定対象である被検試料中の抗原性

10 物質としては、不溶性担体への結合が可能で、且つ該抗原性物質に対応するポリクローナル抗体やモノクローナル抗体が入手あるいは調製可能であるものが好ましいが、上記ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体調製の容易性の点からは、上記抗原性物質は分子量10,000以上の蛋白質、糖蛋白質等の物質であることが好ましい。かかる被検試料中

15 の抗原性物質としては、血液試料中のヘモグロビンA1c（以下、HbA1cと略す）を好適に例示することができる。また、本発明における抗原性物質に特異的に結合する抗体としては、ポリクローナル抗体及び／又はモノクローナル抗体を用いることができるが、モノクローナル抗体は、Koehler & Milsteinらの報告した細胞融合法（Nature, 256, 495

20 ～497, 1975）により得ることができる。そして、上記HbA1cに対応する抗体としては、抗HbA1cモノクローナル抗体を例示することができる。

ところで、ELISA法で選別して得たハイブリドーマ細胞の産生するモノクローナル抗体の中に、ラジオイムノアッセイ（RIA）のように、抗原と抗体とを液相中で反応させるアッセイ系では反応しないとい

25 う抗体が存在することはよく知られているが、本発明の凝集イムノアッ

セイ法においては、このようなモノクローナル抗体を用いることは、液相中の抗原性物質とは反応せず、不溶性担体粒子に固相化された抗原性物質と特異的に反応させることが可能となる点で好ましい。

- 本発明による凝集イムノアッセイ法においては、抗原性物質をラテックス等の不溶性担体粒子に結合させた後、モノクローナル抗体を反応させてもラテックス等の不溶性担体粒子が凝集しない可能性が考えられるが、そのような場合でも、抗体複合体を用いて凝集を起こさせることが可能である。すなわち、かかるモノクローナル抗体と、これに選択的に反応する第二抗体とを反応させてモノクローナル抗体複合体をあらかじめ形成させ、かかる抗体複合体をラテックス等の不溶性担体粒子に吸着した抗原性物質と反応させることにより、ラテックス等の不溶性担体粒子同士を凝集させることができる。上記の他に、抗体複合体を形成する方法としては、ビオチン標識したモノクローナル抗体にアビジンを加えて複合体とする方法や、例えば抗体を酵素標識する際に用いられる化学結合による方法等を挙げることができる。

- 不溶性担体粒子に結合させた抗原性物質に、該抗原性物質に特異的な抗体又は抗体複合体を反応させることにより、不溶性担体の選択的な凝集を起こすことができる本発明によれば、免疫測定試薬の製造が単純、容易であるため、保存安定性の高い免疫測定試薬とすることができる。
- すなわち、ラテックス等の不溶性担体粒子に抗原や抗体が実質的に結合されていないため、該不溶性担体粒子として市販の未結合ラテックス粒子等の不溶性担体粒子をそのまま使用することが可能となる。更に抗体についても必ずしも精製品である必要はなく、また試薬が単純なため保存安定性を高く保つことが可能となる。

- また、被検試料中の抗原性物質を、水性媒体中でラテックス等の不溶性担体粒子に結合・吸着させた後、該抗原性物質に対して特異的に結合

- する抗体又は抗体複合体をホスホリルコリン基等の式（I）で表される基を有する化合物を含有する水性媒体中で結合させたものを用いる場合、上記ラテックス等からなる不溶性担体粒子を凝集させ、凝集の程度を測定する際に用いる上記水性媒体としては、上記抗体又は抗体複合体のラ
- 5 テックス等からなる不溶性担体粒子への非特異的吸着・結合を防止しうるのが好ましく、かかる抗体又は抗体複合体の不溶性担体への吸着・結合を防止しうる水性媒体としては、ツイーン（T w e e n）20等の界面活性剤を0.1～0.3%程度含んでいる水性媒体を具体的に例示することができる。
- 10 本発明の凝集反応を行う容器としては特に限定されないが、この種の凝集反応に通常用いられる例えばポリスチレン製試験管等のチューブ状の容器を用いることができる。また、多数検体の同時処理が容易な点を考慮すれば、複数のウェルを有するELISA用プレート（例えば、ナルジェヌンクインターナショナル社製96-ウェルELISA用プレー
- 15 ト「NUNC-IMMUNO PLATE」等）を用いることが可能である。そして、光学的手法によるラテックス等不溶性担体粒子の凝集の測定を容易とする点からは、実質的に透明な容器を用いて反応を行うことが好ましく、また、自動分析機を利用してラテックス等の不溶性担体粒子の凝集を測定する場合には、通常は、該分析機中の反応槽中で凝集反
- 20 応を行わせることとなる。
- 不溶性担体粒子の凝集の程度を測定する方法としては、特に制限されるものではなく、例えば、凝集を定性的ないし半定量的に測定する場合には、既知の試料の濁度の程度との比較から、上記不溶性担体粒子の凝集の程度を目視によって判定することができる（例えば、凝集の少ない
- 25 ものは透明感がある）。一方、該凝集を定量的に測定する場合は、例えば光学的に測定することが簡便性の点から好ましい。かかるラテックス

等からなる不溶性担体粒子の凝集の光学的測定法としては、公知の光学的測定法が利用可能であり、具体的には、凝集塊の形成を濁度の増加として捉えるいわゆる比濁法、凝集塊の形成を粒度分布ないし平均粒径の変化として捉える粒度分布による測定法、凝集塊の形成による前方散乱光の変化を積分球を用いて測定し、透過光強度との比を測定する積分球濁度法等の種々の光学的測定法を利用することができ、また、これらの測定法のそれぞれについて、速度試験（レートアッセイ；異なる時点で少なくとも2つの測定値を得て、これらの時点間における該測定値の増加分、すなわち増加速度に基づき凝集の程度を求める）と、終点試験（エンドポイントアッセイ；通常反応の終点と考えられる特定の時点で1つの測定値を得て、この測定値に基づき凝集の程度を求める）を用いることもできるが、測定の簡便さ、迅速性の点からは、比濁法を用いた速度試験を行うことが好ましい。

不溶性担体粒子の凝集の光学的測定においては、ラテックス等からなる不溶性担体粒子の平均粒径が0.04～0.8ミクロン程度の範囲では、400～1400nm程度の波長の光を用いて測定することが好ましい。

前記本発明の免疫測定試薬としては、目的の抗原性物質を測定する試薬とホスホリルコリン基等の式（I）で表される基を有する化合物を含有するものであれば、その試薬構成は特に制限されるものでなく、例えば不溶性担体粒子、緩衝剤、試料中の抗原に結合する抗体及び式（I）で表される基を有する化合物を含有し、必要に応じて界面活性剤、防腐剤、試料中の抗原に結合する抗体に結合する抗体等を含有する試薬キットを挙げることができ、特に、不溶性担体粒子及び緩衝剤を含む第一試薬と、式（I）で表される基を有する化合物及び抗原に結合する抗体を含む第二試薬からなる試薬キットを具体的に例示することができ、かか

る試薬キットにおける第一試薬及び第二試薬には、必要に応じてさらに界面活性剤、防腐剤、試料中の抗原に結合する抗体、該抗体に結合する抗体複合体形成用抗体等を含有しておくこともできる。

(実施例)

- 5 以下、本発明を実施例、比較例、参考例により、更に詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は、かかる実施例等により何ら制限を受けるものではない。

実施例 1

下記組成の試薬を調製した。

10 [R 1 試薬]

HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.8) 4.77 g/L

ラテックス粒子 (粒径 0.0775 μ m、積水化学社製)

0.033 重量% / L

NaN₃ (関東化学社製)

0.1 g / L

15 [R 2 試薬]

HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.0) 4.77 g/L

塩化ナトリウム (和光純薬社製) 15 g/L

ポリマー 2 (参考例 2 で製造) 2 g/L

NaN₃ (関東化学社製) 0.1 g / L

20 抗ヒトHbA1c マウスモノクローナル抗体 (製造例 1)

0.025 g (IgG 換算) / L

抗マウス IgG ヤギポリクローナル抗体 (和光純薬社製)

0.025 g (IgG 換算) / L

実施例 2

- 25 下記組成の試薬を調製した。

[R 1 試薬]

- HEPES緩衝剤（同仁化学社製、pH 7.8） 4.77 g/L
ラテックス粒子（粒径0.0775 μm、積水化学社製）
0.033重量%/L
NaN₃（関東化学社製） 0.1 g/L
- 5 [R2試薬]
HEPES緩衝剤（同仁化学社製、pH 7.0） 4.77 g/L
塩化ナトリウム（和光純薬社製） 15 g/L
ポリマー3（参考例3で製造） 2 g/L
NaN₃（関東化学社製） 0.1 g/L
- 10 抗ヒトHbA1cマウスモノクローナル抗体
0.025 g（IgG換算）/L
抗マウスIgGヤギポリクローナル抗体（和光純薬社製）
0.025 g（IgG換算）/L
- 比較例1
- 15 実施例1におけるポリマー2や実施例2におけるポリマー3に代えて
ツイーン20を含む下記組成の試薬を調製した。
[R1試薬]
HEPES緩衝剤（同仁化学社製、pH 7.8） 4.77 g/L
ラテックス粒子（粒径0.0775 μm、積水化学社製）
20 0.033重量%/L
NaN₃（関東化学社製） 0.1 g/L
[R2試薬]
HEPES緩衝剤（同仁化学社製、pH 7.0） 4.77 g/L
塩化ナトリウム（和光純薬社製） 15 g/L
25 ツイーン20（和光純薬社製） 2 g/L
NaN₃（関東化学社製） 0.1 g/L

抗ヒトHbA1cマウスモノクローナル抗体

0.025g (IgG換算) / L

抗マウスIgGヤギポリクローナル抗体 (和光純薬社製)

0.025g (IgG換算) / L

5 比較例 2

実施例 1 におけるポリマー 2 や実施例 2 におけるポリマー 3 に代えてブリッジ 30 を含む下記組成の試薬を調製した。

[R 1 試薬]

HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.8) 4.77g / L

10 ラテックス粒子 (粒径 0.0775 μ m、積水化学社製)

0.033 重量% / L

NaN₃ (関東化学社製) 0.1g / L

[R 2 試薬]

HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.0) 4.77g / L

15 塩化ナトリウム (和光純薬社製) 15g / L

ブリッジ 30 (シグマ社製) 2g / L

NaN₃ (関東化学社製) 0.1g / L

抗ヒトHbA1cマウスモノクローナル抗体

0.025g (IgG換算) / L

20 抗マウスIgGヤギポリクローナル抗体 (和光純薬社製)

0.025g (IgG換算) / L

比較例 3

実施例 1 におけるポリマー 2 や実施例 2 におけるポリマー 3 に代えてブリッジ 56 を含む下記組成の試薬を調製した。

25 [R 1 試薬]

HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.8) 4.77g / L

ラテックス粒子（粒径 $0.0775 \mu\text{m}$ 、積水化学社製）

$0.033 \text{ 重量} \% / \text{L}$

NaN_3 （関東化学社製）

$0.1 \text{ g} / \text{L}$

〔R2 試薬〕

5 HEPES 緩衝剤（同仁化学社製、 $\text{pH} 7.0$ ） $4.77 \text{ g} / \text{L}$

塩化ナトリウム（和光純薬社製） $15 \text{ g} / \text{L}$

ブリッジ 56（シグマ社製） $2 \text{ g} / \text{L}$

NaN_3 （関東化学社製） $0.1 \text{ g} / \text{L}$

抗ヒト HbA1c マウスモノクローナル抗体

10 $0.025 \text{ g (IgG 換算)} / \text{L}$

抗マウス IgG ヤギポリクローナル抗体（和光純薬社製）

$0.025 \text{ g (IgG 換算)} / \text{L}$

実施例 3

- 人血液を EDTA 採血管（ベノジェクト真空採血管テルモ社製）で採
- 15 血後、2 時間放置して沈殿した血球層 $10 \mu\text{L}$ をとり、精製水 1 mL で希釈して、これを -20°C で凍結保存し使用直前に融解したものを検体とし、実施例 1、実施例 2、比較例 1、比較例 2 及び比較例 3 でそれぞれ作製した R1 試薬と R2 試薬を用いて HbA1c 濃度の測定を行った。また、検量線は、自動グリコヘモグロビン分析計 HLC-723 GHb
- 20 V（東ソー社製）による測定で HbA1c 値が、 0.0% 、 4.2% 、 7.7% 、 11.3% 、 14.8% であった標準検体を開封直後の試薬を用いて作成した。検体中の HbA1c の測定は、R1 試薬溶液 $240 \mu\text{L}$ に上記調製した検体を $8.0 \mu\text{L}$ 添加し、 37°C 、5 分間反応させた後、R2 試薬溶液 $80 \mu\text{L}$ を添加し、 37°C 5 分後に 2 ポイントエンド法（測光ポイント 16—34）、主波長 450 nm 、副波長 800 nm
- 25 m で吸光度変化量を、日立自動分析装置 7170 型を使用して行い、検

量線より求めた。この操作を繰り返し、合計 10 回ずつ測定し、平均値、標準偏差、及び同時再現性 $[(標準偏差 \times 100) / 平均]$ を求めた。結果を表 1 に示す。表 1 から、本発明の実施例 1 及び実施例 2 においては、比較例 1 ～ 3 と比べ、凝集量が安定化し、再現性の改善が認められる。

(表 1)

測定回数	実施例 1	実施例 2	比較例 1	比較例 2	比較例 3
1	6.3	6.3	6.3	6.3	6.5
2	6.4	6.3	6.4	6.4	6.4
3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.1
4	6.3	6.3	6.4	6.2	6.3
5	6.3	6.3	6.3	6.6	6.2
6	6.4	6.4	6.5	6.5	6.4
7	6.3	6.3	6.2	6.2	6.5
8	6.3	6.3	6.2	6.2	6.3
9	6.3	6.3	6.3	6.3	6.4
10	6.3	6.3	6.4	6.2	6.4
平均	6.3	6.3	6.3	6.3	6.4
標準偏差	0.040	0.030	0.090	0.133	0.120
同時再現性	0.63%	0.48%	1.42%	2.10%	1.90%

実施例 4

10 下記組成の試薬を調製した。

[R 1 試薬]

HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.8) 4.77 g/L

ラテックス粒子 (粒径 0.0775 μ m、積水化学社製)

0.033 重量% / L

15 NaN₃ (関東化学社製) 0.1 g/L

ポリマー 4 (参考例 4 で製造) 1 g/L

[R 2 試薬]

- HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.0) 4.77 g/L
 塩化ナトリウム (和光純薬社製) 15 g/L
 ツイーン 20 (和光純薬社製) 2 g/L
 NaN₃ (関東化学社製) 0.1 g/L
 5 抗ヒトHbA1c マウスモノクローナル抗体
 0.025 g (IgG換算) /L
 抗マウス IgG ヤギポリクローナル抗体 (和光純薬社製)
 0.025 g (IgG換算) /L

実施例 5

- 10 下記組成の試薬を調製した。

[R1 試薬]

- HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.8) 4.77 g/L
 ラテックス粒子 (粒径 0.0775 μm、積水化学社製)
 0.033 重量% /L
 15 NaN₃ (関東化学社製) 0.1 g/L
 ポリマー 5 (参考例 5 で製造) 1 g/L

[R2 試薬]

- HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.0) 4.77 g/L
 塩化ナトリウム (和光純薬社製) 15 g/L
 20 ツイーン 20 (和光純薬社製) 2 g/L
 NaN₃ (関東化学社製) 0.1 g/L
 抗ヒトHbA1c マウスモノクローナル抗体
 0.025 g (IgG換算) /L
 抗マウス IgG ヤギポリクローナル抗体 (和光純薬社製)
 0.025 g (IgG換算) /L
 25

実施例 6

下記組成の試薬を調製した。

[R 1 試薬]

HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.8) 4.77 g/L

ラテックス粒子 (粒径 0.0775 μ m、積水化学社製)

5 0.033 重量% / L

NaN₃ (関東化学社製) 0.1 g/L

ポリマー 1 (参考例 1 で製造) 0.002 g/L

[R 2 試薬]

HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.0) 4.77 g/L

10 塩化ナトリウム (和光純薬社製) 15 g/L

ツイーン 20 (和光純薬社製) 2 g/L

NaN₃ (関東化学社製) 0.1 g/L

抗ヒトHbA1c マウスモノクローナル抗体

0.025 g (IgG 換算) / L

15 抗マウス IgG ヤギポリクローナル抗体 (和光純薬社製)

0.025 g (IgG 換算) / L

比較例 4

実施例 4 におけるポリマー 4 や実施例 5 におけるポリマー 5 や実施例 6 におけるポリマー 1 を含まない下記組成の試薬を調製した。

20 [R 1 試薬]

HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.8) 4.77 g/L

ラテックス粒子 (粒径 0.0775 μ m、積水化学社製)

0.033 重量% / L

NaN₃ (関東化学社製) 0.1 g/L

25 [R 2 試薬]

HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.0) 4.77 g/L

塩化ナトリウム（和光純薬社製） 15 g / L

ツイーン 20（和光純薬社製） 2 g / L

NaN₃（関東化学社製） 0.1 g / L

抗ヒトHbA1cマウスモノクローナル抗体

5 0.025 g（IgG換算） / L

抗マウスIgGヤギポリクローナル抗体（和光純薬社製）

0.025 g（IgG換算） / L

実施例 7

- 人血液をEDTA採血管（ベノジェクト真空採血管テルモ社製）で採
 10 血後、2時間放置して沈殿した血球層10μLをとり、精製水1mLで
 希釈して、これを-20℃で凍結保存し使用直前に融解したものを検体
 とし、実施例4～実施例6、比較例4で作製したR1試薬とR2試薬を
 それぞれ用いて、HbA1c濃度の測定を実施例3と同様に行った。結
 果を表2に示す。表2から、本発明の実施例4～実施例6においては、
 15 比較例4と比べ、凝集量が安定化し、再現性の改善が認められる。
 （表2）

測定回数	実施例 4	実施例 5	実施例 6	比較例 4
1	6.3	6.3	6.3	6.5
2	6.3	6.3	6.4	6.3
3	6.3	6.2	6.2	6.3
4	6.3	6.3	6.3	6.1
5	6.3	6.3	6.2	6.2
6	6.3	6.2	6.3	6.4
7	6.3	6.3	6.3	6.3
8	6.3	6.3	6.3	6.4
9	6.2	6.3	6.3	6.3
10	6.3	6.3	6.3	6.2
平均	6.3	6.3	6.3	6.3
標準偏差	0.030	0.040	0.054	0.110
同時再現性	0.48%	0.64%	0.86%	1.74%

実施例 8

下記組成の試薬を調製した。

[R 1 (ラテックス) 溶液の調製]

- 5 HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.8) 4.77 g/L
 ラテックス (粒径 0.0775 μ m、積水化学社製)
 0.033 重量% / L
 NaN₃ (関東化学社製) 0.1 g/L
 ポリマー 4 (参考例 4 で製造) 2 g/L

10 [R 2 (抗体) 溶液の調製]

- HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.0) 4.77 g/L
 塩化ナトリウム (和光純薬社製) 15 g/L
 ツイーン 20 (和光純薬社製) 2 g/L
 NaN₃ (関東化学社製) 0.1 g/L
 15 抗ヒト HbA1c マウスモノクローナル抗体
 0.025 g (IgG 換算) / L
 抗マウス IgG ヤギポリクローナル抗体 (和光純薬社製)
 0.025 g (IgG 換算) / L

実施例 9

- 20 下記組成の試薬を調製した。

[R 1 試薬]

- HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.8) 4.77 g/L
 ラテックス (粒径 0.0775 μ m、積水化学社製)
 0.033 重量% / L
 25 NaN₃ (関東化学社製) 0.1 g/L
 ポリマー 4 (参考例 4 で製造) 5 g/L

[R 2 試薬]

- HEPES緩衝剤（同仁化学社製、pH 7.0） 4.77 g/L
 塩化ナトリウム（和光純薬社製） 15 g/L
 ツイーン20（和光純薬社製） 2 g/L
 5 NaN₃（関東化学社製） 0.1 g/L
 抗ヒトHbA1cマウスモノクローナル抗体
 0.025 g（IgG換算）/L
 抗マウスIgGヤギポリクローナル抗体（和光純薬社製）
 0.025 g（IgG換算）/L

10 実施例10

- 人血液をEDTA採血管（ベノジェクト真空採血管テルモ社製）で採血後、2時間放置して沈殿した血球層10 μ Lをとり、精製水で全量を1 mLとしたものを検体1とした。また、人血液をEDTA採血管（ベノジェクト真空採血管テルモ社製）で採血後、2時間放置して得られた
- 15 上澄み液4 μ Lと、沈殿した血球層10 μ Lをとり、精製水で全量を1 mLとしたものを検体2とした。これら検体と実施例4、実施例8、実施例9及び比較例4で作製したR1試薬とR2試薬をそれぞれ用いて、HbA1c濃度の測定を実施例3と同様に行った。各検体についての3
- 20 回の測定結果を結果を表3に示す。表3から、本発明の実施例4、実施例8及び実施例9、特にポリマー含量が多い実施例8及び実施例9においては、比較例4と比べ、検体に血漿成分が混入した検体2においても凝集量が安定化し、再現性の改善が認められる。

(表 3)

試 薬	検体 1	検体 2
実施例 4	6.6	6.1
実施例 8	6.7	6.5
実施例 9	6.7	6.7
比較例 4	6.6	5.1

参考例 1 (ポリマー 1 の合成)

MPC (日本油脂社製) 35.7 g、BMA (和光純薬工業社製) 4.3 g をエタノール 160 g に溶解し、4 つ口フラスコに入れ、30 分間窒素を吹込んだ後、60℃で重合開始剤 AIBN (和光純薬工業社製) 0.82 g を加えて 8 時間重合反応させた。重合液を 3 L のジエチルエーテル中に攪拌しながら滴下し、析出した沈殿を濾過し、48 時間室温で真空乾燥を行って、MPC 0.8 モル、BMA 0.2 モルの比率からなる共重合体 (ポリマー 1) の粉末を得た。このポリマー 1 の分子量をゲルパーミエーションクロマトグラフィー (以下、GPC と略す) により分析した結果、重量平均分子量 153,000 であった。なお、分析条件はリン酸バッファー (pH 7.4、20 mM) を溶離液とし、ポリエチレングリコールを標準物質とし、UV (210 nm) 及び屈折率にて検出した (参考例 2 ~ 5 も同じ)。

参考例 2 (ポリマー 2 の合成)

MPC 20.3 g、BMA 9.75 g をエタノール 120 g に溶解し、4 つ口フラスコに入れ、30 分間窒素を吹込んだ後、60℃で AIBN 0.35 g を加えて 8 時間重合反応させた。重合液を 3 L のジエチルエーテル中に攪拌しながら滴下し、析出した沈殿を濾過し、48 時間室温で真空乾燥を行って、MPC 0.5 モル、BMA 0.5 モルの比率からなる共重合体 (ポリマー 2) の粉末を得た。このポリマー 2 の分子量を GPC により分析した結果、重量平均分子量 224,000 であった。

参考例 3 (ポリマー 3 の合成)

MPC 14.1 g、BMA 15.9 g をエタノール 120 g に溶解し、4 つ口フラスコに入れ、30 分間窒素を吹込んだ後、60℃で AIBN 0.35 g を加えて 8 時間重合反応させた。重合液を 3 L のジエチルエーテル中に攪拌しながら滴下し、析出した沈殿を濾過し、48 時間室温で真空乾燥を行って、MPC 0.3 モル、BMA 0.7 モルの比率からなる共重合体 (ポリマー 3) の粉末を得た。このポリマー 3 の分子量を、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC) により分析した結果、重量平均分子量 130,000 であった。

10 参考例 4 (ポリマー 4 の合成)

MPC 50.0 g をエタノール 160 g に溶解し、4 つ口フラスコに入れ、30 分間窒素を吹込んだ後、60℃で AIBN 0.24 g を加えて 8 時間重合反応させた。重合液を 3 L のジエチルエーテル中に攪拌しながら滴下し、析出した沈殿を濾過し、48 時間室温で真空乾燥を行って、MPC のホモポリマー (ポリマー 4) の粉末を得た。このポリマー 4 の分子量を、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC) により分析した結果、重量平均分子量 529,000 であった。

参考例 5 (ポリマー 5 の合成)

MPC 30.0 g をエタノール 120 g に溶解し、4 つ口フラスコに入れ、30 分間窒素を吹込んだ後、60℃で AIBN 0.48 g を加えて 8 時間重合反応させた。重合液を 3 L のジエチルエーテル中に攪拌しながら滴下し、析出した沈殿を濾過し、48 時間室温で真空乾燥を行って、MPC のホモポリマー (ポリマー 5) の粉末を得た。このポリマー 5 の分子量を、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC) により分析した結果、重量平均分子量 183,000 であった。

参考例 6 (ヘモグロビン A1c β 鎖 N 末端のグリコペプチドエピトープ

に対するモノクローナル抗体の作製)

- 特開平 7-35752 号公報記載の製造例 1 の記載に従って、ヘモグロビン β 鎖の N 末端アミノ酸配列に相当するペプチド Val - His - Leu - Thr - Pro - Cys を合成し、N 末端アミノ酸残基である Val の α -
- 5 アミノ基にグルコースを非酵素的に結合させて、グリコペプチドを合成し、更にスパーサーを介してキャリアー蛋白に結合させ、それを免疫原とすることにより、常法により、Hb A1c と反応し、Hb A0 と反応しないモノクローナル抗体を得た。該モノクローナル抗体は、遊離の Hb A1c とは反応せず、不溶性担体粒子に結合した Hb A1c と反応する
- 10 抗体であった。

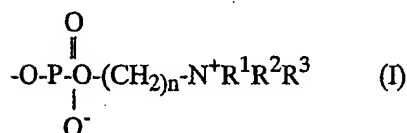
産業上の利用可能性

- Pc 基等の式 (I) で表される基を有する化合物を用いる本発明によると、ラテックス等からなる不溶性担体粒子を用いた免疫凝集反応が安
- 15 定化・均一化し、再現性の良い測定結果を得ることができる。

請 求 の 範 囲

1. 抗原又は抗体を実質的に結合していない状態にある不溶性担体粒子
 に対して、被検試料中の抗原性物質を結合させ、該抗原性物質に特異的
 5 に反応する抗体又は抗体複合体を結合させて、不溶性担体粒子を選択的
 に凝集させる凝集イムノアッセイ法において、式（I）

（化学式1）



- （式中、nは1～6の整数、R¹、R²及びR³は、同一又は異なって、
 10 水素、炭素数1～6の置換又は非置換アルキルを示す。）で表される基
 を有する化合物を用いることを特徴とする凝集イムノアッセイ法。
2. 式（I）で表される基を有する化合物が、式（I）で表される基を
 有する単量体を重合させて得られる化合物であることを特徴とする請求
 項1記載の凝集イムノアッセイ法。
- 15 3. 式（I）で表される基を有する化合物が、式（I）で表される基を
 有する単量体と、該式（I）で表される基を有する単量体と重合可能な
 他の単量体とを重合させて得られる化合物であることを特徴とする請求
 項1記載の凝集イムノアッセイ法。
4. 式（I）で表される基を有する単量体と重合可能な他の単量体が、
 20 ビニル基を有する単量体であることを特徴とする請求項3記載の凝集イ
 ムノアッセイ法。
5. ビニル基を有する単量体が、メタクリル酸-n-ブチルであること
 を特徴とする請求項4記載の凝集イムノアッセイ法。
6. 式（I）で表される基を有する単量体が、式（I）で表される基と

ビニル基を有する単量体であることを特徴とする請求項 2 ～ 5 のいずれか記載の凝集イムノアッセイ法。

7. 式 (I) で表される基が、ホスホリルコリン基であることを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の凝集イムノアッセイ法。

5 8. 式 (I) で表される基とビニル基を有する単量体が、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンであることを特徴とする請求項 6 記載の凝集イムノアッセイ法。

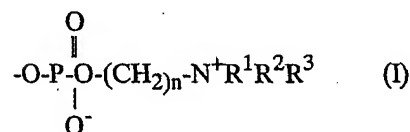
9. 抗体が抗ヘモグロビン A 1 c モノクローナル抗体である請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の凝集イムノアッセイ法。

10 10. 抗体複合体が、抗原性物質に特異的に反応する抗体と、これに選択的に反応する第二抗体からなる請求項 1 ～ 9 のいずれかの凝集イムノアッセイ法。

11. 不溶性担体が、ポリスチレン系ラテックスである請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載の凝集イムノアッセイ法。

15 12. 抗原又は抗体を実質的に結合していない状態にある不溶性担体粒子に対して、被検試料中の抗原性物質を結合させ、該抗原性物質に特異的に反応する抗体又は抗体複合体を結合させて、不溶性担体粒子を選択的に凝集させる凝集イムノアッセイ法に用いる、式 (I)

(化学式 2)



20

(式中、n は 1 ～ 6 の整数、R¹、R² 及び R³ は、同一又は異なって、水素、炭素数 1 ～ 6 の置換又は非置換アルキルを示す。) で表される基を有する化合物を含有することを特徴とする免疫測定試薬。

13. 式 (I) で表される基を有する化合物が、式 (I) で表される基

を有する単量体を重合させて得られる化合物であることを特徴とする請求項 1 2 記載の免疫測定試薬。

- 1 4. 式 (I) で表される基を有する化合物が、式 (I) で表される基を有する単量体と、該式 (I) で表される基を有する単量体と重合可能な他の単量体を重合させて得られる化合物であることを特徴とする請求項 1 2 記載の免疫測定試薬。

1 5. 式 (I) で表される基を有する単量体と重合可能な他の単量体が、ビニル基を有する単量体であることを特徴とする請求項 1 4 記載の免疫測定試薬。

- 10 1 6. ビニル基を有する単量体が、メタクリル酸-n-ブチルであることを特徴とする請求項 1 5 記載の免疫測定試薬。

1 7. 式 (I) で表される基を有する単量体が、式 (I) で表される基とビニル基を有する単量体であることを特徴とする請求項 1 3 ~ 1 6 のいずれか記載の免疫測定試薬。

- 15 1 8. 式 (I) で表される基が、ホスホリルコリン基であることを特徴とする請求項 1 2 ~ 1 7 のいずれか記載の免疫測定試薬。

1 9. 式 (I) で表される基とビニル基を有する単量体が、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンである請求項 1 7 記載の免疫測定試薬。

- 20 2 0. 抗体が抗ヘモグロビン A 1 c モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 1 2 ~ 1 9 のいずれか記載の免疫測定試薬。

2 1. 抗体複合体が、抗原性物質に特異的に反応する抗体と、これに選択的に反応する第二抗体からなることを特徴とする請求項 1 2 ~ 2 0 のいずれか記載の免疫測定試薬。

- 25 2 2. 不溶性担体が、ポリスチレン系ラテックスであることを特徴とする請求項 1 2 ~ 2 1 のいずれか記載の免疫測定試薬。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07385

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. ⁷ G01N33/543		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl. ⁷ G01N33/543		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1992-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2001 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2001 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2001		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 62-218865 A (Hitachi Chemical Co., Ltd.), 26 September, 1987 (26.09.87), (Family: none)	1-22
A	JP 61-274261 A (Nitto Electric Co., Ltd.), 04 December, 1986 (04.12.86), (Family: none)	1-22
A	JP 8-101196 A (Oriental Yeast Co., Ltd.), 16 April, 1996 (16.04.96), (Family: none)	1-22
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 September, 2001 (11.09.01)		Date of mailing of the international search report 18 September, 2001 (18.09.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/543

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/543

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1992-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2001年
日本国登録実用新案公報	1994-2001年
日本国実用新案登録公報	1996-2001年

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 62-218865 A(日立化成工業株式会社), 26. 9月. 1987(26. 09. 87), (ファミリーなし)	1-22
A	JP 61-274261 A(日東電気工業株式会社), 4. 12月. 1986(04. 12. 86), (ファミリーなし)	1-22
A	JP 8-101196 A(オリエンタル酵母工業株式会社), 16. 4月. 1996 (16. 04. 96), (ファミリーなし)	1-22

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 09. 01

国際調査報告の発送日

18.09.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JPO)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

宮澤 浩



2J 9407

電話番号 03-3581-1101 内線 3250